



**SAHLGRENSKA AKADEMIN**

## **Beteendeeffekter av ketamin och elektrokonvulsiv terapi**

Examensarbete i medicin

Linus Sandgren

Läkarprogrammet

Göteborg, Sverige 2021

Handledare: Elias Eriksson

Institutionen för neurovetenskap och fysiologi

<b>Innehållsförteckning</b>	<b>Sidnummer</b>
<b>1. Lista över förkortningar</b>	3
<b>2. Abstract</b>	4-5
<b>3. Introduktion</b>	
3.1. <i>Depression</i>	6
3.2. <i>ECT</i>	6-7
3.3. <i>Ketamin</i>	7-8
<b>4. Syfte</b>	8
4.1. <i>Vetenskaplig frågeställning</i>	8
<b>5. Metod</b>	
5.1. <i>Försöksdjur</i>	9
5.2. <i>Läkemedelshantering</i>	9-10
5.3. <i>Elektrokonvulsiv stimulering</i>	10
5.4. <i>Forced swim test</i>	10-11
5.5. <i>Locomotor activity</i>	11
5.6. <i>Statistisk analys</i>	11
5.7. <i>Studiedesign</i>	12
<b>6. Resultat</b>	
6.1. <i>Effekt av ketamin (20 mg/kg) i FST 24 h efter behandling</i>	13
6.2. <i>Effekt av ketamin (20 mg/kg) på spontan lokomotion i LMA 48 h efter behandling</i>	13-14
6.3. <i>Effekt av ketamin (20 mg/kg) på apomorfin-inducerad (1 mg/kg) lokomotion 48 h efter behandling.</i>	14
6.4. <i>Effekt av ECS, NBQX (30 mg/kg) och kombination därutav i FST 24 h efter avslutad behandling</i>	15
6.5. <i>Effekt av ECS, NBQX (30 mg/kg) och kombination därutav på spontan lokomotion 48 h efter avslutad behandling</i>	15-16
6.6. <i>Effekt av ECS, NBQX (30 mg/kg) och kombination därutav på apomorfin-inducerad lokomotion 48 h efter avslutad behandling</i>	16
<b>7. Diskussion</b>	
7.1. <i>FST 24 h efter ketamin/NaCl</i>	17
7.2. <i>LMA 48 h efter ketamin/NaCl</i>	17-18
7.3. <i>FST 24 h efter ECS/sham+ NBQX/NaCl</i>	18
7.4. <i>LMA 48 h efter ECS/sham+NBQX/NaCl</i>	18-19
7.5. <i>FST validitet</i>	19-20
7.6. <i>NBQX</i>	20
7.7. <i>Metodologiska/etiska överväganden</i>	21
7.7.1. <i>Replace</i>	21
7.7.2. <i>Reduce</i>	21
7.7.3. <i>Refine</i>	21-22
<b>8. Konklusion</b>	22
<b>9. Populärvetenskaplig sammanfattning</b>	22-23
<b>10. Tack</b>	23
<b>11. Referenser</b>	24-26

### **Lista över förkortningar**

ANOVA	Analysis of variance
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
CUMS	Chronic unpredictable mild stress
ECS	Elektroconvulsive stimulation
ECT	Electroconvulsive therapy
FST	Forced swim test
HCl	Saltsyra
LSD	Least significant difference
NaCl	Natriumklorid
NBQX	2,3-dioxo-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[f]quinoxaline
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartate
NMRI	Naval Medical Research Institute
SSRI	Selektiva serotonin-återupptagshämmare
TCA	Tricykliska antidepressiva

## **Behavioral effects of ketamine and electroconvulsive therapy**

### **Abstract**

*Background:* Depression is a common disease that causes a great deal of suffering to whoever is affected. Even though a variety of different pharmacological treatments have been developed during the last century, a significant proportion of patients remain ill despite treatment attempts. This warrants further research regarding the mechanism of action for antidepressant agents.

Ever since its introduction, electroconvulsive therapy (ECT) has been a mainstay in the treatment for depression. Its mechanisms of action remain elusive, however some evidence suggests a role for alteration of dopamine transmission. The N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor antagonist ketamine was recently approved as a treatment for therapy-resistant depression.  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid-receptor signaling (AMPA) has been suggested to be important for the antidepressant effect of ketamine. Similarities in onset of action, treatment effect, as well as duration have given rise to a hypothesis of possible common mechanism of action. Therefore the present study aimed to explore whether the antidepressant treatments ketamine and ECT have common mechanisms of action involving glutamate and dopamine signaling.

*Material/method:* Forced swim test (FST) and assessment of locomotor activity (LMA) were utilized to investigate the behavioural effects of ketamine and electroconvulsive stimulation (ECS) on mice, respectively, and whether cotreatment with the AMPA receptor antagonist 2,3-dioxo-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[f]quinoxaline (NBQX) could impinge upon the behavioural effects of ECS.

*Results:* We failed to detect an antidepressant-like effect of ketamine in FST. Ketamine was, however, found to significantly increase both spontaneous locomotion and the locomotive response to apomorphine. ECS increased immobility in FST, contrary to what was hypothesized. Co-treatment with NBQX was found to reduce this behavioural effect. No significant difference in locomotive response to apomorphine was demonstrated in ECS-treated animals.

*Conclusion:* No antidepressant-like effect of ketamin could be demonstrated in the FST. The enhanced locomotor response in the ketamine-treated mice is suggestive of an increased dopaminergic transmission. The effects of ECS and NBQX in FST were inconclusive. No proof for enhanced dopamine signalling as a result of ECS was found.

**Keywords:** ECT, ketamine, antidepressive effect, AMPA, dopamine.

## **Introduktion**

### *Depression*

Depression är en vanlig psykiatrisk sjukdom som kännetecknas av sänkt grundstämning, oförmåga att känna lust, samt ökad uttrötthet. Enligt Världshälsoorganisationen är mer än 264 miljoner människor drabbade världen över och depression anses utgöra en dominerande orsak till ohälsa(1). Under det gångna seklet har ett flertal farmakologiska såväl som samtalsterapeutiska behandlingsmöjligheter utvecklats men trots detta förblir en betydande andel patienter sjuka trots upprepade behandlingsförsök(2).

### *ECT*

Sedan elektrokonvulsiv terapi (ECT) togs i bruk för mer än 80 år sedan har den varit en hörnsten i behandlingsarsenalen mot depression. Alternativa farmakologiska behandlingar har sedan dess tillkommit men ECT har av flera skäl behållit sin aktualitet. Jämfört med klassiska läkemedel såsom selektiva serotonin-återupptagshämmare (SSRI) eller tricykliska antidepressiva (TCA) har ECT en starkare antidepressiv effekt(3). Behandlingseffekten kommer dessutom snabbare vilket har gjort ECT till ett bra alternativ exempelvis då suicidrisken bedöms hög och snabb antidepressiv effekt är angelägen(4). Därutöver har ECT befunnits mer effektivt än övrig behandling vid terapi-resistent depression(4).

ECT utförs genom att ström leds mellan två elektroder som applicerats på huvudet på en sövd och muskelrelaxerad person varpå epileptisk aktivitet framkallas i hjärnan. Experiment har vid vårt laboratorium tidigare utförts för att kasta ljus över de antidepressiva verkningsmekanismerna för ECT. Inom ramen för monoaminhypotesen, enligt vilken depression beror på minskade koncentrationer av monoaminerna serotonin och/eller noradrenalin och/eller dopamin i synapsklyftan, kunde Kjell Modigh påvisa ökad lokomotion efter administrering av dopaminreceptoragonisten apomorfin i en musmodell för ECT

(electroconvulsive shocks, ECS)(5). Resultatet ansågs ge stöd åt uppfattningen att främjandet av dopaminerg signalering möjligen kunde ligga bakom behandlingseffekten. På annat håll har man i samband med ECT-behandlingen av möss administrerat den glutamaterga *N*-methyl-D-aspartate receptor-receptorantagonisten (NMDA) MK-801 och därigenom kunnat upphäva den apomorfinpotentierande effekten av ECS på lokomotion(6). Den epileptiska aktivitet som uppstår i samband med behandlingen resulterar i riklig frisättning av neurotransmittorer, däribland glutamat, som utgör den främsta excitoriska signalsubstansen i hjärnan. Härmed tycks det rimligt att glutamat skulle kunna spela en roll för behandlingseffekten, vilket även stöds av beteendeförsök som har visat på en koppling mellan antidepressiv effekt av ECS och uttryck av den glutamaterga  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid –receptorn (AMPA)(7).

### *Ketamin*

År 2000 genomfördes de första randomiserade kliniska prövningarna som kunde påvisa snabb och relativt bestående antidepressiv effekt av en låg dos med NMDA-receptorantagonisten ketamin(8). Sedan dess har likartad effekt även gått att påvisa hos individer med terapiresistent depression vilket bidrog till att Socialstyrelsen godkände ketamin som behandling på denna indikation i oktober 2020(9, 10). Dess snabbt insättande behandlingseffekt gör ketamin till ett lovande alternativ till ECT vid depression med suicidrisk. Dess antisuicidala effekt har befunnits likvärdig men med mindre grad av de kognitiva biverkningar som ECT är behäftad med(11). En omständighet som emellertid begränsar användandet av ketamin är dess missbrukspotential(12).

Sedan Skolnick 1990 var först med att påvisa antidepressiv verkan i beteendeförsök av NMDA-receptorantagonister har omfattande forskning bedrivits för att klarlägga den antidepressiva mekanismen(13). Enligt en hypotes utövar ketamin sin effekt genom att indirekt orsaka glutamatfrisättning i olika områden av hjärnan vilket i sin tur leder till

stimulering av glutamaterga receptorer(14, 15). Till stöd för denna uppfattning har man i forced swim test (FST) kunnat påvisa snabb och bestående antidepressiv effekt av ketamin vilken reverseras genom samtidig behandling med AMPA-receptorantagonisten 2,3-dioxo-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[f]quinoxaline (NBQX)(16). I samma modell har snabb men övergående effekt kunnat påvisas av AMPA-potentieraren LY392098 vilket talar för att AMPA-signalering är viktig för att ketamin skall utöva antidepressiv effekt, men ensamt inte räcker till(17).

På Sektionen för farmakologi vid Göteborgs Universitet har den lokomotionspotentierande effekten hos NMDA-receptorantagonister tidigare studerats. På möss vars monoamindepåer uttömts genom förbehandling med reserpin kunde man påvisa kraftig synergistisk verkan hos den icke-kompetitiva NMDA receptorantagonisten MK-801 och dopaminreceptoragonisten apomorfin(18).

## **Syfte**

Syftet med denna studie är att bidra till ökad förståelse för om det finns gemensamma antidepressiva verkningsmekanismer hos ketamin och ECS involverande signalämnena glutamat och dopamin genom att studera beteendeffekter på mus.

## *Vetenskapliga frågeställningar*

*i) Kan vi replikera en snabbverkande antidepressiv effekt av ketamin respektive ECS på mus i FST? ii) Kan vi blockera den antidepressiva effekten av ECS på mus i FST genom samtidig behandling med NBQX? iii) Kan vi påvisa dopaminpotentierande effekt av ketamin respektive ECS på mus vad avser lokomotorisk aktivitet (LMA)? iv) Kan vi blockera en eventuellt dopaminpotentierande effekt av ECS på mus i LMA genom samtidig behandling med AMPA-receptorantagonisten NBQX?*



## **Metod**

### *Försöksdjur*

Till experimenten användes hanmöss av stammen "Naval Medical Research Institute" (NMRI). Dessa tillhandahölls av Charles River (Tyskland) och vägde 18-20 gram vid ankomst. Djuren acklimatiserades till den nya miljön 7 dygn innan de användes i försök. Mössen hölls i burar med 6-8 djur vardera under 12 timmars ljus/mörk-cykel och med fri tillgång till foder och vatten. All hantering och experimentell verksamhet skedde i enlighet med etikgodkännande med diarienummer 5.8.18-02142/2019 som utfärdats 2019-02-27.

Till ketamin-försöken användes 30 djur som fördelades lika mellan behandlingsgrupperna. Till ECS-försöken användes 84 djur. 48 stycken fördelades jämnt mellan ECS-grupperna och 36 fördelades jämnt mellan sham-grupperna. Under behandlingens gång dog 7 djur ur ECS+NBQX-gruppen och 6 djur ur ECS+NaCl-gruppen. I samtliga experiment slumpades försöksdjuren till behandlingsgrupp med undantag för två möss som placerades i Sham+NaCl-gruppen. Detta gjordes mot bakgrund av deras ringa kroppsvikt och det faktum att både ECS och daglig NBQX-behandling vid tidigare försök har resulterat i påtaglig viktnedgång för sofliga möss.

### *Läkemedelshantering*

Ketamin (Ketalar®, Pfizer, Kronans apotek) blandades med 0,9 % natriumkloridlösning (NaCl, salin) för att frambringa en lösning med koncentrationen 2 mg/ml vilken doserades 20 mg/kg.

NBQX (Sigma-Aldrich, Tyskland) löstes i salin till en koncentration av 3 mg/ml. Denna lösning doserades 30 mg/kg. Apomorfin hydroklorid (Sigma-Aldrich, Tyskland) löstes i salin

vilket gav en lösning med koncentrationen 0,1 mg/ml vilken doserades 1 mg/kg. Samtliga injektioner administrerades intraperitonealt (i.p.) i volym om 10 ml/kg.

#### *Elektrokonvulsiv stimulering*

ECS levererades genom salinfuktade alligatorklämmor som applicerades till öronen på musen. Behandlingen utfördes en gång dagligen i sju dagar. Inför varje behandling vägdes djuren för att bestämma dosering av strömstyrka, för att upptäcka viktnedgång som tecken på illabefinnande samt för att dosera korrekt volym av läkemedel. Strömstyrkan doserades enligt följande: <28 g=14 mA; 28-35 g=15 mA; >35 g=16 mA. Övrig karakteristika hos strömmen var: frekvens: 100 Hz, pulsvidd: 0,5 ms, chockduration: 1 s.

Om strömmen framkallade ett toniskt-kloniskt anfall hos musen med toniskt extenderade extremiteter i 5-10 sekunder följt av konvulsioner i fram- och bakben i 5-10 sekunder betraktades behandlingen som framgångsrikt utförd. I annat fall försäkrades klämmornas korrekta placering varpå strömstyrkan höjdes med 1 mA och ström administrerades på nytt. Kontrollgruppen utsattes för ”sham-shock” vilket innebär att de hanterades på exakt samma sätt som behandlingsgruppen förutom att ingen ström levererades. 30 minuter senare administrerades NBQX eller salin. En gång dagligen i två dagar innan behandlingen inleddes tilläts mössen habitueras till alligatorklämmorna genom att dessa monteras på öronen under ett par minuters tid.

#### *Forced swim test*

Mössen placerades individuellt i transparenta plastcylindrar rymmandes vatten med temperaturen 24-26 °C. Cylindrarna hade dimensionerna 30 cm i diameter och var avskärmade för att hindra mössen från att se varandra. Mössen filmades under 6 minuter varav de sista 4 minuterna utgjorde underlag för analys. Filmerna delades in i fem sekunder

långa intervall som klassificerades utifrån det beteende som musen företrädesvis haft(19). Då musen flöt passivt i vattnet eller utförde små balanserande rörelser med extremiteterna betecknades detta immobilitet medan övrig aktivitet betecknades simning. Försöket blindades genom att granskaren av filmerna var ovetandes om vilken behandling varje mus erhölet.

#### *Locomotor activity*

För mätning av LMA utnyttjades plexiglaslådor, med dimensionerna 40 x 40 x 20 cm, som placerats i ljudisolerade plywoodlådor (Kungsbacka mät- och reglerteknik, Fjärås, Sverige). Plexiglaslådornas väggar hade utrustats med fotosensorer bildandes ett rutnät av detektionszoner. Mössen placerades individuellt i plexiglaslådorna och tilläts habitueras varpå de injicerades med apomorfin och placerades i lådorna i 30 minuter. Habitueringstiden var 40 minuter i ketamin/NaCl-försöket och 30 minuter i ECS/sham-försöket. Lådorna var kopplade till en dator (Activity Monitor SOF 811, Med Associates, Vermont, USA) som registrerade sekvenser av detektioner och klassificerade dessa enligt det antal gånger som djuret passerat en detektionszon, för att på så vis mäta lokomotion.

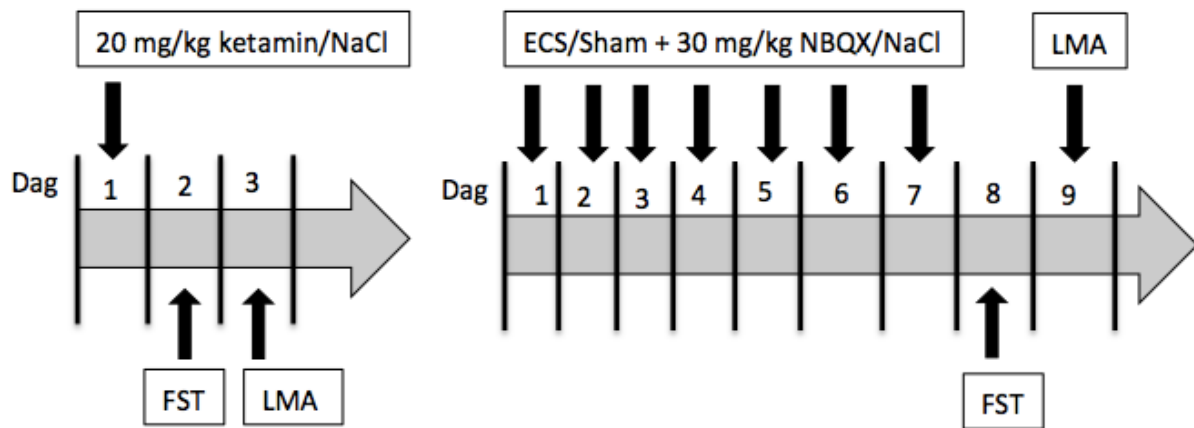
#### *Statistisk analys*

För statistiska beräkningar användes SPSS. Signifikansnivån var vid samtliga beräkningar satt till  $\alpha = 0.05$ . Enstaka outliers exkluderades. Bedömning av normalfördelning inom behandlingsgrupperna gjordes med Shapiro-wilk test. Vid normalfördelade data från ketaminförsöken utfördes independent-samples t-test och i annat fall användes Mann-Whitney U-test. Vid beräkningar rörande ECS-försöken utfördes vid normalfördelade data analysis of variance (ANOVA) och därefter Fischer's Least Significant Difference test (LSD). I frånvaro av normalfördelning utfördes Kruskal-Wallis H-test följt av Mann-Whitney U-test.

### Studiedesign

De beteendemässiga effekterna av ketamin testades genom att möss behandlades med en intraperitonell injektion med antingen 20 mg/kg ketamin eller NaCl. 24 h efter behandling utfördes FST och 48 h efter behandling utfördes LMA.

De beteendemässiga effekterna av ECS och NBQX på mus testades genom att ECS eller sham administrerades en gång per dag i sju konsekutiva dagar. 30 minuter efter varje behandling gavs en intraperitonell injektion med antingen 30 mg/kg NBQX eller NaCl. 24 h efter sista ECS-behandlingen utfördes FST och 48 h efter sista ECS-behandlingen utfördes LMA (figur 1).

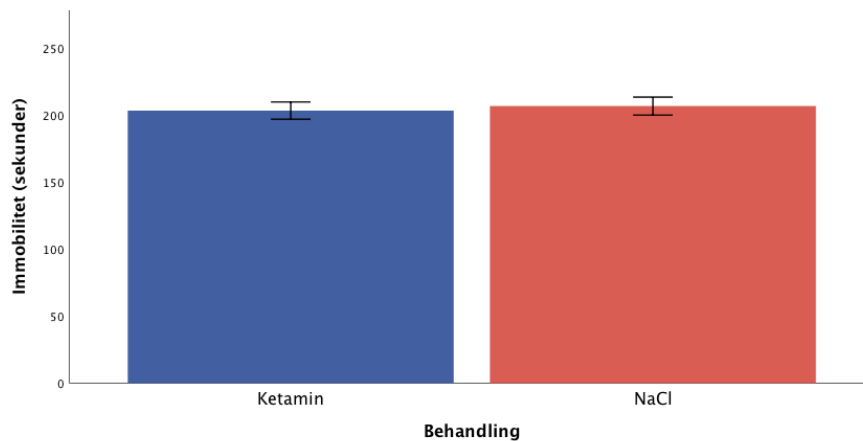


**Figur 1.** Illustration av studiedesign för respektive försök. Siffrorna ovan de grå pilarna anger antal dagar från försöksstart. De lodräta pilarna anger på vilka dagar som behandling har givits och beteendeförsök har utförts. ECS= elektrokonvulsiv stimulering, FST= forced swim test, LMA= locomotor activity, NaCl= Natriumklorid, NBQX= 2,3-dioxo-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[f]quinoxaline.

## Resultat

### *Effekt av ketamin (20 mg/kg) i FST 24 h efter behandling*

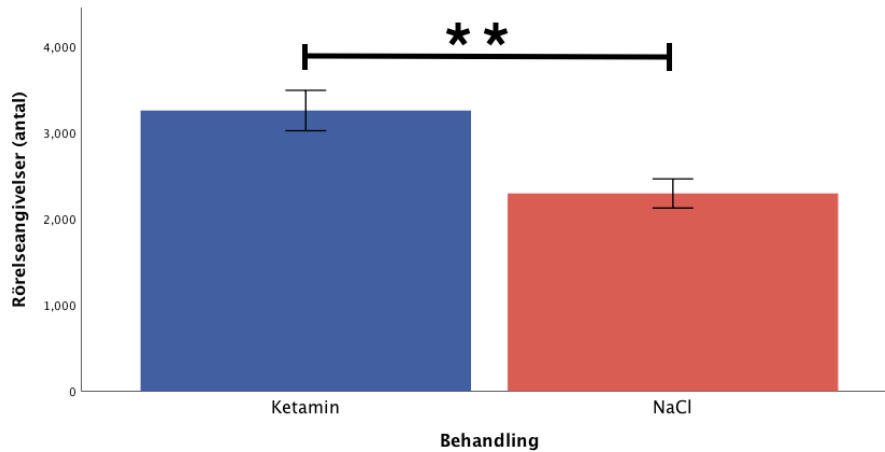
Ett independent-samples t-test utfördes för att jämföra immobilitet mellan behandlinggrupperna. Det gick inte att påvisa en signifikant skillnad mellan ketamin (M=208, SD=18) och NaCl (M=206, SD=26);  $t(25)=.141$ ,  $p=.889$ . Resultatet talar för att ketamin i denna studie inte utövar en beteendepåverkan i FST (Figur 2).



**Figur 2.** Effekt av ketamin (20 mg/kg) i FST. Ketamin administrerades intraperitonealt (i.p.) 24 h innan testet. Y-axeln anger tiden som mössen var immobila (sekunder). Data uttrycks som medelvärde  $\pm$  SEM (n=15).

### *Effekt av ketamin (20 mg/kg) på spontan lokomotion i LMA 48 h efter behandling.*

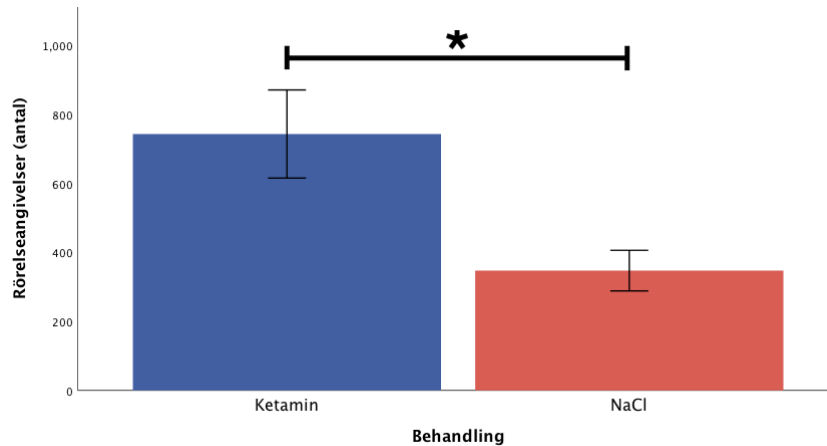
Ett independent-samples t-test utfördes för att jämföra spontan lokomotion mellan behandlingsgrupperna. Det gick att påvisa ett signifikant högre antal aktivitetsregistreringar hos möss som behandlats med ketamin (M=3251, SD=905) jämfört med NaCl (M=2290, SD=653);  $t(25)=3.33$ ,  $p=.003$ . Detta talar för att ketamin i denna studie har en lokomotionshöjande effekt (Figur 3).



**Figur 3.** Effekt av ketamin (20 mg/kg) på spontan lokomotion. Ketamin administrerades i.p. 48 h innan testet. Y-axeln anger antal aktivitetsregistreringar. Data uttrycks som medelvärde  $\pm$  SEM (n=15). \*\* p<0.01, t-test.

*Effekt av ketamin (20 mg/kg) på apomorfín-inducerad (1 mg/kg) lokomotion 48 h efter behandling*

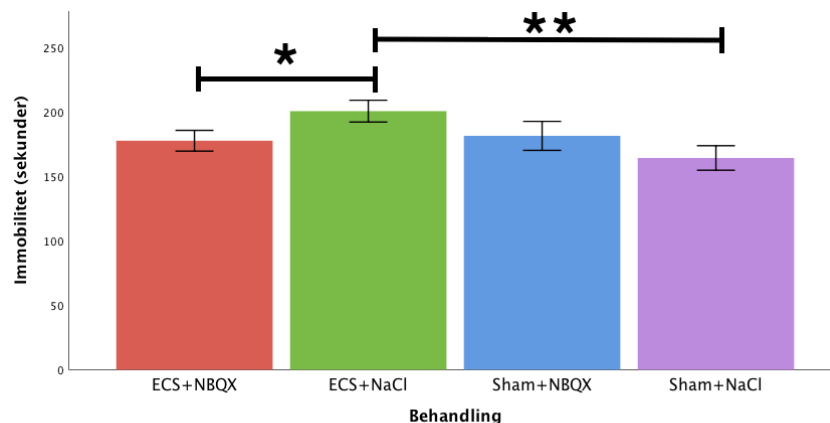
Ett independent-samples t-test utfördes för att jämföra skillnad i apomorfín-inducerad lokomotion mellan behandlingsgrupperna. Det gick att påvisa ett högre antal aktivitetsregistreringar bland möss som behandlats med ketamin (M=743, SD=478) jämfört med NaCl (M=347, SD=220);  $t(18)=2.82$ ,  $p=.011$  (Figur 4).



**Figur 4.** Effekt av ketamin (20 mg/kg) på apomorfín-inducerad (1 mg/kg) lokomotion. Ketamin administrerades i.p. 48 h innan testet. Y-axeln anger antal aktivitetsregistreringar under 30 minuter. Data uttrycks som medelvärde  $\pm$  SEM (n=15). \* p< 0.05, t-test.

### *Effekt av ECS, NBQX (30 mg/kg) och kombination därutav i FST 24 h efter avslutad behandling*

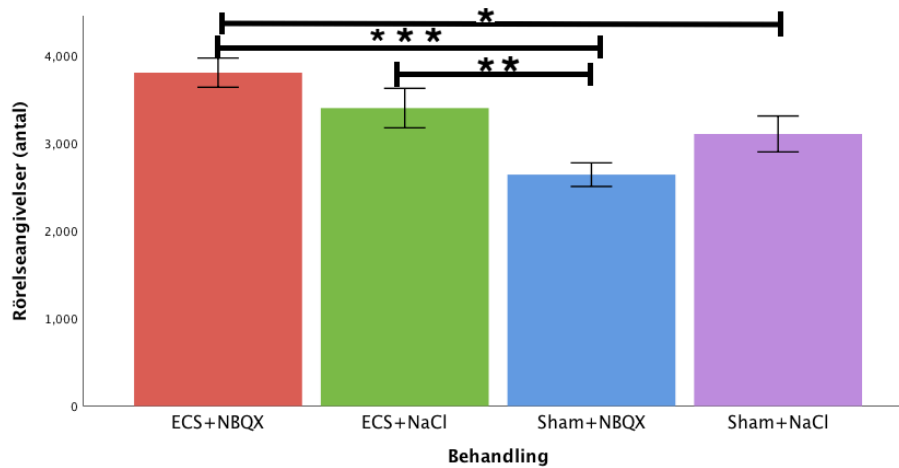
Ett Kruskal Wallis test visade att det var skillnad i immobilitet mellan behandlingsgrupperna,  $H(3)=9.57$ ,  $p=.023$  (Figur 5). Jämförelser mellan behandlingsgrupperna med Mann-Whitney U test avslöjade en signifikant immobilitetsökning hos ECS+NaCl (Median=215) jämfört med Sham+NaCl (Median=170),  $U=63.5$ ,  $p=.005$ , respektive ECS+NBQX (Median=185),  $U=96.5$ ,  $p=.039$ . En trend mot ökad immobilitet kunde ses hos Sham+NBQX (Median=203) jämfört med Sham+NaCl (Median=170),  $U=87.5$ ,  $p=.087$ .



**Figur 5.** Effekt av upprepad ECS och NBQX (30 mg/kg) i FST 24 h efter avslutad behandling. Y-axeln anger tiden som mössen var immobila (sekunder). Data uttrycks som medelvärde  $\pm$  SEM ( $n=17-18$ ) och analyserades med Kruskal Wallis test följt av Mann Whitney U-test. \*  $p < 0.05$  jämfört med ECS+NaCl, \*\*  $p < 0.01$  jämfört med Sham+NaCl.

### *Effekt av ECS, NBQX (30 mg/kg) och kombination därutav på spontan lokomotion 48 h efter avslutad behandling*

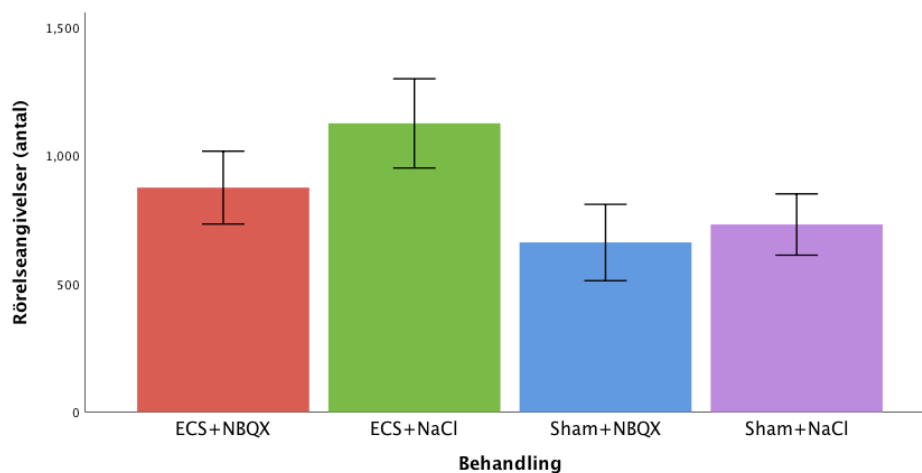
En ANOVA visade signifikant skillnad i behandlingseffekt på spontan lokomotion,  $F(3,63) = 6.43$ ,  $p=.001$ . Post hoc-jämförelser avslöjade att ECS+NBQX ( $M=3797$ ,  $SD=665$ ) uppvisade signifikant ökad lokomotion jämfört med Sham+NBQX ( $M=2635$ ,  $SD=538$ ) respektive Sham+NaCl ( $M=3098$ ,  $SD=843$ ). Ökad lokomotion kunde även påvisas hos ECS+NaCl ( $M=3393$ ,  $SD=955$ ) jämfört med Sham+NBQX ( $M=2635$ ,  $SD=538$ ) (Figur 6).



**Figur 6.** Effekt av upprepad ECS och NBQX (30 mg/kg) på spontan lokomotion 48 h efter avslutad behandling. Y-axeln anger antal aktivitetsregistreringar under 30 minuter. Data uttrycks som medelvärde  $\pm$  SEM (n=17-18) och analyserades med ANOVA följt av Fischer's LSD. \* $p < 0.05$  jämfört med Sham+NaCl, \*\* $p < 0.01$  jämfört med Sham+NBQX, \*\*\*\* $p < 0.001$  jämfört med Sham+NBQX.

*Effekt av ECS, NBQX (30 mg/kg) och kombination därutav på apomorfin-inducerad lokomotion 48 h efter avslutad behandling*

Ett Kruskal-Wallis test kunde inte påvisa någon signifikant skillnad på apomorfin-inducerad lokomotion mellan behandlingsgrupperna ( $H(3) = 6.42$ ,  $p = .093$ ) (Figur 7).



**Figur 7.** Effekt av upprepad ECS och NBQX (30 mg/kg) på apomorfin-inducerad (1 mg/kg) lokomotion 48 h efter avslutad behandling. Y-axeln anger antal aktivitetsregistreringar under 30 minuter. Data uttrycks som medelvärde  $\pm$  SEM (n=17-18) och analyserades med Kruskal Wallis test.



## **Diskussion**

### *FST 24 h efter ketamin/NaCl*

Vi lyckades inte påvisa immobilitetsminskande effekt av ketamin i FST trots att flera andra forskargrupper har lyckats med detta(20-24). Medan en tanke kan ägnas åt huruvida drogen var duglig eller injektionerna utfördes korrekt ter sig dessa felkällor mindre sannolika mot bakgrund av att samma möss uppvisade behandlingseffekt i LMA. Effekten av ketamin i FST har i vår forskargrupp tidigare undersökts med varierande resultat. En tänkbar förklaring som formulerats är att behandlingseffekten är förhållandevis svag i jämförelse med det stora antal faktorer som har visats kunna påverka resultatet(25). En forskargrupp som misslyckades med att påvisa immobilitetsminskande effekt av ketamin i FST på naiva möss kunde se en signifikant behandlingseffekt efter att ha genomfört stressprotokollet Chronic Unpredictable Mild Stress (CUMS) varför ett sätt att öka känsligheteten i modellen skulle kunna vara att låta försöksdjuren genomgå ett stressprotokoll(26).

Till dessa försök har någon positiv kontroll inte använts. Somliga argumenterar för nyttan av att använda positiv kontroll i form av antidepressiva läkemedel med känd effekt under de givna förhållandena(27). Ett sådant förfarande skulle möjligen öka tillförlitligheten hos resultatet och underlätta tolkningen av eventuell batch-variabilitet men skulle även innebära att ett större antal djur åtgick till varje försök. Vad som rätt att göra i förhållande till den djuretiska principen att reducera antal djur i forskning är därför inte självklart.

### *LMA 48 h efter ketamin/NaCl*

Den påvisade skillnaden i apomorfin-inducerad lokomotion är i linje med Carlsson & Carlsson(18) och stödjer hypotesen om ökad dopaminerg receptorkänslighet. Våra tillvägagångsätt skiljer sig emellertid åt på en viktig punkt. Carlsson & Carlsson förbehandlade försöksdjuren med reserpin vilket gjorde dessa så gott som orörliga innan

apomorfinbehandling. I våra försök användes inget reserpin vilket tillåter ett tvådelat utförande av LMA med mätning av dels spontan lokomotion såväl som apomorfin-inducerat lokomotorsvar. Ketamin befanns även öka både spontan lokomotion och apomorfinsvaret. Båda dessa observationer skulle kunna vara uttryck för en ökad responsivitet i dopaminerga receptorer eller strukturer associerade till dessa.

#### *FST 24 h efter ECS/sham+NBQX/NaCl*

ECS har visats minska immobilitet i FST på både råttor och mus(28-32). I de angivna artiklarna är effekten bestående trots metodologiska variationer såsom stam, antal behandlingar och användning av narkosmedel. Vid vårt laboratorium har effekten av ECS i FST på mus tidigare testats med varierande resultat(icke publicerade data) där ECS har visats både signifikant öka och minska immobilitet. Batch-variabilitet har föreslagits som bidragande orsak medan opålitligheten i FST som modell även framhållits.

Enligt hypotesen som formulerats inför försöket skulle ECS+NaCl utöva en immobilitetsminskande effekt i FST vilken skulle reverseras hos ECS+NBQX om AMPA-signalering var viktig för att effekt skulle komma till uttryck. Trots att effekten av ECS var den motsatta till vad vi förutsåg kunde vi påvisa en signifikant minskning av immobilitet hos ECS+NBQX jämfört med ECS+NaCl vilket talar för att AMPA-signalering är av betydelse för utveckling av de beteendemässiga förändringarna av ECS. Vidare gick det inte att påvisa någon egen effekt av NBQX som skulle kunna konfundera resultatet.

#### *LMA 48 h efter ECS/sham+NBQX/NaCl*

Även om det inte med säkerhet säger hur det förhåller sig vid tillfället för FST 24 h tidigare kan en jämförelse av lokomotion under habitueringsfasen ändå ge en fingervisning ifall en

beteendeskilling i FST är ett uttryck för en skillnad i spontan lokomotion. Om Sham+NaCl respektive ECS+NBQX uppvisade ökad lokomotion gentemot ECS+NaCl skulle det möjligen kunna förklara resultatet i FST. Till stöd för denna tänkbara felkälla rörde sig ECS+NBQX insignifikant mer än ECS+NaCl medan ECS+NaCl å andra sidan rörde sig insignifikant mer än Sham+NaCl vilket talar emot lokomotion som konfunderande faktor i FST.

Efter apomorfinbehandling kunde en insignifikant trend mot ökad lokomotion av ECS+NaCl påvisas. ECS+NBQX uppvisade något lägre lokomotion än ECS+NaCl. Gruppkillnaderna var insignifikanta vilket motiverar återhållsamhet i tolkningen men talar för en trend åt ökad dopaminkänslighet av ECS samt en hämning av denna beteendeffekt genom AMPA-receptorblockad vilket är i linje med vår hypotes. Jämförelsen av spontan lokomotion innan apomorfininjektion avslöjade emellertid en höjd spontan lokomotion hos ECS+NBQX jämfört med sham+NaCl och hos ECS+NaCl jämfört med sham+NBQX.

Effekten av apomorfin på lokomotion är dosberoende. Vid låg dos (0.1-0.2 mg/kg) har apomorfin en sederande och lokomotionsminskande effekt(33). Hög dos apomorfin (1.0-1.5 mg/kg), som använts vid våra försök, har istället en stimulerande effekt på lokomotion(5, 6).

#### *FST validitet*

Trots att FST är en vida tillämpad beteendemodell är dess värde ifrågasatt. Det passiva beteendet som uppstår hos mössen under testets gång är en fråga som har vållat diskussion. Somliga har argumenterat för att detta är ett depressionsliknande tillstånd medan andra menar att det snarare rör sig om ett energimässigt fördelaktigt beteende som mössen uppvisar när de ställs inför en akut och ofrånkomlig stressande situation(34, 35). Därutöver kan preparat som kräver dagar till veckor innan de har antidepressiv effekt i en klinisk situation påverka beteendet i FST redan efter 15 minuter. Dessa svagheter till trots besitter testet hög grad av

prediktiv validitet(36). Såväl som antidepressiva läkemedel som medel med allmänt lokomotionshöjande effekt har befunnits minska immobilitet varför FST med fördel kombineras med en mätning av spontan lokomotion.

### *NBQX*

I forskargruppen har snarlika försök som i denna rapport tidigare utförts. NBQX (10 mg/kg) misslyckades då att reversera beteendeeffekten av ECS. Med denna dos hade effekten av ketamin kunnat reverseras i FST(16). En tänkbar förklaring var att dosen NBQX var otillräcklig vid administrering av ECS där frisättning av transmittorsubstans kunde tänkas vara rikligare. Vid användning av NBQX i andra försök har högre dos förekommit varför vi nu valde att upprepa försöken med dosen 30 mg/kg(37).

Medan effekten av NBQX på krampträskeln är oklar har antiepileptiskt effekt påvisats av andra AMPA-antagonister(38, 39). Eftersom den antidepressiva effekten av ECT är beroende av intensiteten hos det framkallade anfallet skulle administrering av NBQX strax innan ECS därmed kunna komplicera tolkningen av resultatet så till vida att en effekt av NBQX skulle kunna bero på dess hämning av den antidepressiva mekanismen lika gärna som av dess antikonvulsiva egenskaper(40). Svensson et al kunde reversera den apomorfinpotentierande effekten av ECS på lokomotion genom att administrera NMDA-receptorantagonisten MK-801 30 minuter efter varje behandling(6). Detta talar för att glutamaterg signalering är betydelsefull postiktalt och vi har därför valt samma förfarande med NBQX för att undanröja ovan nämnda konfunderande faktor. Halveringstiden för NBQX har beräknats till 1-4 h och behandling med NBQX bör därför inte påverka effekten av ECS dagen därpå(41).

### *Metodologiska/etiska överväganden*

I utformandet och genomförandet av försöken som har legat till grund för denna rapport har hänsyn tagits till de tre djuretiska principerna som fastslår att forskning ska bedrivas på ett så litet antal djur som möjligt av ett slag som är så evolutionärt lågt stående som möjligt och ska utföras på ett sätt som orsakar så lite lidande som möjligt. I enlighet med dessa principer som kallas 'de tre R:en', 'replace', 'reduce' och 'refine', har följande överväganden gjorts:

#### *Replace*

Då målsättningen har varit att studera beteendeeffekter och möjligheten att manipulera dessa har det inte varit aktuellt att använda t.ex. cellkulturer. Vidare har urvalet av modellorganism kommit att begränsas till råttor och mus p.g.a. avsaknad av metod för att administrera ECS och att studera antidepressivt svar hos lägre stående organismer. Trots att prediktiv validitet för FST är högre för råttor föll valet på mus på grund av att råttor löper större risk att drabbas av frakturer i samband med ECS-behandlingen(36, 42).

#### *Reduce*

Strävan mot att reducera antalet försöksdjur innebär en risk att begå typ 2-fel vilken får ställas mot risken att använda ett för stort antal djur vilket kan medföra att små skillnader utan klinisk relevans påvisas mellan grupperna. En poweranalys låter sig inte göras då storlek av behandlingseffekt såväl som variabiliteten i utfall är svår att förutse. Antal försöksdjur har valts med ledning av tidigare artiklar som berör liknande försök.

#### *Refine*

ECS kan utföras med eller utan anestesimedel. För att reducera stress och lidande är det förra alternativet att föredra. Narkosmedel har emellertid visats influera signalering via AMPA- respektive NMDA-receptorer vilket lämnar utrymme för att användning av narkosmedel kan

tänkas störa försöket. Mot bakgrund av detta har vi beslutat att utföra försöket utan anestesi(43).

### **Konklusion**

Vi kunde inte påvisa antidepressiv-liknande effekt av ketamin i FST. Ketamin befanns öka både spontan lokomotion såväl som apomorfin-inducerad lokomotion. ECS utövade en immobilitetsökande effekt i FST vilket var motsatt till det förväntade resultatet. NBQX befanns motverka denna beteendeffekt. Ingen signifikant skillnad i apomorfin-inducerad lokomotion kunde påvisas i de ECS-behandlade mössen

### **Populärvetenskaplig sammanfattning**

Depression är en vanlig sjukdom som kännetecknas av sänkt grundstämning, nedsatt lust och ökad uttrötthet. Under det gångna seklet har ett flertal olika behandlingar utvecklats mot depression. Majoriteten av dessa förutsätter daglig behandling under lång tid vilket resulterar i en gradvis insättande behandlingseffekt. Beklämmande nog förblir en icke försumbar andel av patienter sjuka trots upprepade behandlingsförsök, varför ytterligare forskning är motiverad för att utveckla mer effektiv behandling.

Ketamin som i sjukvården tidigare använts som sömnmedel och smärtstillande har nyligen godkänts av Socialstyrelsen som behandling mot svårbehandlad depression och utgör i det här sammanhanget en spännande substans. Till skillnad från ovan nämnda läkemedel kan nämligen en enstaka dos med ketamin åstadkomma en snabb och ihållande antidepressiv effekt. Detta talar för att ketamin utövar sin effekt genom verkningsmekanismer skilda från klassiska antidepressiva medel, vilket också styrks av djurexperimentella försök.

Den kontroversiella behandlingen elektrokonvulsiv terapi (ECT) har sedan introduktionen för över 80 år sedan varit en hörnsten i behandlingsarsenalen mot depression. ECT sker genom

att en elektrisk ström leds mellan två elektroder som applicerats på huvudet hos en sövd och muskelavslappnad person. Detta utövar antidepressiv effekt genom mekanismer som ännu är ofullständigt klarlagda men likheter i behandlingseffekt med ketamin har gett upphov till en idé om delvis gemensamma verkningsmekanismer. Syftet med våra försök har varit undersöka ifall så är fallet genom att studera beteendeffekter av dessa behandlingar på möss. Den ena beteendemodellen kallas "Forced swim test" (FST) och bygger på observationen att en mus som placeras i en behållare med vatten under en kort stund inledningsvis kommer simma med stor iver för att efter hand anta ett mer passivt beteende. Antidepressiva behandlingar, däribland ketamin och ECS, har visats öka tiden som mössen simmar och en sådan beteendepåverkan har därför kommit att tolkas som en antidepressiv effekt. Det andra testet bygger på antagandet att ett ämne i hjärnan som kallas dopamin både spelar en roll vid rörelse och förflyttning såväl som i sjukdomsprocesserna som orsakar depression. Om en antidepressiv behandling befinner öka benägenheten som möss att springa runt och utforska när de placeras inuti en tom låda skulle det kunna tala för att behandlingseffekten därmed beror av en påverkan på dopaminfunktionen i hjärnan. Utifrån våra försök går det inte att säga säkert hur det förhåller sig och för att kunna dra säkra slutsatser krävs ytterligare försök.

## **Tack**

Jag vill uttrycka tacksamhet till Daniela Atanasovski, Alexander Lisinski och Jenny Steen som har varit hjälpsamma i utförandet av försöken samt i sammanställningen av denna rapport.

## Referenser

1. Organization WH. Depression Genève: World Health Organization; [cited 2021 Jan 15]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>.
2. Rush AJ, Trivedi MH, Wisniewski SR, Nierenberg AA, Stewart JW, Warden D, et al. Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: a STAR\*D report. *Am J Psychiatry*. 2006;163(11):1905-17.
3. Janicak PG, Davis JM, Gibbons RD, Ericksen S, Chang S, Gallagher P. Efficacy of ECT: a meta-analysis. *Am J Psychiatry*. 1985;142(3):297-302.
4. Folkerts HW, Michael N, Tölle R, Schonauer K, Mücke S, Schulze-Mönking H. Electroconvulsive therapy vs. paroxetine in treatment-resistant depression -- a randomized study. *Acta Psychiatr Scand*. 1997;96(5):334-42.
5. Modigh K. Electroconvulsive shock and postsynaptic catecholamine effects: increased psychomotor stimulant action of apomorphine and clonidine in reserpine pretreated mice by repeated ECS. *J Neural Transm*. 1975;36(1):19-32.
6. Nomikos GG, Mathé AA, Mathé JM, Svensson TH. MK-801 prevents the enhanced behavioural response to apomorphine elicited by repeated electroconvulsive treatment in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 1992;108(3):367-70.
7. Hao X, Zhu X, Li P, Lv F, Min S. NMDA receptor antagonist enhances antidepressant efficacy and alleviates learning-memory function impairment induced by electroconvulsive shock with regulating glutamate receptors expression in hippocampus. *J Affect Disord*. 2016;190:819-27.
8. Berman RM, Cappiello A, Anand A, Oren DA, Heninger GR, Charney DS, et al. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry*. 2000;47(4):351-4.
9. Zarate CA, Jr., Singh JB, Carlson PJ, Brutsche NE, Ameli R, Luckenbaugh DA, et al. A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Arch Gen Psychiatry*. 2006;63(8):856-64.
10. Socialstyrelsen. Nationella riktlinjer för vård vid depression och ångestsyndrom [Internet] Stockholm: Socialstyrelsen; 2020 [cited 2020 14 december]. Available from: <https://www.socialstyrelsen.se/globalassets/sharepoint-dokument/artikelkatalog/nationella-riktlinjer/2020-9-6936.pdf>.
11. Kheirabadi D, Kheirabadi GR, Mirlohi Z, Tarrahi MJ, Norbaksh A. Comparison of Rapid Antidepressant and Antisuiicidal Effects of Intramuscular Ketamine, Oral Ketamine, and Electroconvulsive Therapy in Patients With Major Depressive Disorder: A Pilot Study. *J Clin Psychopharmacol*. 2020;40(6):588-93.
12. Fass. Fass [Internet] Stockholm: Fass; [cited 2020 -12-14]. Available from: <https://www.fass.se/LIF/product?userType=0&nplId=20181012000036 - caution>.
13. Trullas R, Skolnick P. Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. *Eur J Pharmacol*. 1990;185(1):1-10.
14. Moghaddam B, Adams B, Verma A, Daly D. Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *J Neurosci*. 1997;17(8):2921-7.
15. Homayoun H, Moghaddam B. NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons. *J Neurosci*. 2007;27(43):11496-500.



16. Maeng S, Zarate CA, Jr., Du J, Schloesser RJ, McCammon J, Chen G, et al. Cellular mechanisms underlying the antidepressant effects of ketamine: role of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors. *Biol Psychiatry*. 2008;63(4):349-52.
17. Li X, Tizzano JP, Griffey K, Clay M, Lindstrom T, Skolnick P. Antidepressant-like actions of an AMPA receptor potentiator (LY392098). *Neuropharmacology*. 2001;40(8):1028-33.
18. Carlsson M, Carlsson A. Dramatic synergism between MK-801 and clonidine with respect to locomotor stimulatory effect in monoamine-depleted mice. *J Neural Transm*. 1989;77(1):65-71.
19. Slattery DA, Cryan JF. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. *Nat Protoc*. 2012;7(6):1009-14.
20. Wilson C, Li S, Hannan AJ, Renoir T. Antidepressant-like effects of ketamine in a mouse model of serotonergic dysfunction. *Neuropharmacology*. 2020;168:107998.
21. Ebrahimi-Ghiri M, Shahini F, Khakpai F, Zarrindast MR. Antinociceptive and antidepressive efficacies of the combined ineffective doses of S-ketamine and URB597. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2019;392(11):1393-400.
22. Fukumoto K, Toki H, Iijima M, Hashihayata T, Yamaguchi JI, Hashimoto K, et al. Antidepressant Potential of (R)-Ketamine in Rodent Models: Comparison with (S)-Ketamine. *J Pharmacol Exp Ther*. 2017;361(1):9-16.
23. Wei MD, Wang YH, Lu K, Lv BJ, Wang Y, Chen WY. Ketamine reverses the impaired fear memory extinction and accompanied depressive-like behaviors in adolescent mice. *Behav Brain Res*. 2020;379:112342.
24. Khakpai F, Ebrahimi-Ghiri M, Alijanpour S, Zarrindast MR. Ketamine-induced antidepressant like effects in mice: A possible involvement of cannabinoid system. *Biomed Pharmacother*. 2019;112:108717.
25. Bogdanova OV, Kanekar S, D'Anci KE, Renshaw PF. Factors influencing behavior in the forced swim test. *Physiol Behav*. 2013;118:227-39.
26. Pałucha-Poniewiera A, Podkowa K, Rafał-Ulińska A. The group II mGlu receptor antagonist LY341495 induces a rapid antidepressant-like effect and enhances the effect of ketamine in the chronic unpredictable mild stress model of depression in C57BL/6J mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2021;109:110239.
27. Kara NZ, Stukalin Y, Einat H. Revisiting the validity of the mouse forced swim test: Systematic review and meta-analysis of the effects of prototypic antidepressants. *Neurosci Biobehav Rev*. 2018;84:1-11.
28. Socała K, Nieoczym D, Wyska E, Właż P. Effect of sildenafil on the activity of some antidepressant drugs and electroconvulsive shock treatment in the forced swim test in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2017;390(4):339-49.
29. Jonckheere J, Deloulme JC, Dall'igna G, Chauliac N, Pelluet A, Nguon AS, et al. Short- and long-term efficacy of electroconvulsive stimulation in animal models of depression: The essential role of neuronal survival. *Brain Stimul*. 2018;11(6):1336-47.
30. Suzuki M, Masuda Y. Effect of repeated electroconvulsive shock treatment on a depression model, mouse forced swimming. *Tohoku J Exp Med*. 1999;189(1):83-6.
31. Karolewicz B, Paul IA, Antkiewicz-Michaluk L. Effect of NOS inhibitor on forced swim test and neurotransmitters turnover in the mouse brain. *Pol J Pharmacol*. 2001;53(6):587-96.
32. Kobayashi Y, Segi-Nishida E. Search for factors contributing to resistance to the electroconvulsive seizure treatment model using adrenocorticotrophic hormone-treated mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2019;186:172767.

33. Serra G, Argiolas A, Fadda F, Melis MR, Gessa GL. Repeated electroconvulsive shock prevents the sedative effect of small doses of apomorphine. *Psychopharmacology (Berl)*. 1981;73(2):194-6.
34. Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. "Behavioural despair" in rats and mice: strain differences and the effects of imipramine. *Eur J Pharmacol*. 1978;51(3):291-4.
35. Commons KG, Cholanians AB, Babb JA, Ehlinger DG. The Rodent Forced Swim Test Measures Stress-Coping Strategy, Not Depression-like Behavior. *ACS Chem Neurosci*. 2017;8(5):955-60.
36. Borsini F, Meli A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacology (Berl)*. 1988;94(2):147-60.
37. Witkin JM. Blockade of the locomotor stimulant effects of cocaine and methamphetamine by glutamate antagonists. *Life Sci*. 1993;53(24):P1405-10.
38. Mareš P, Kubová H. Perampanel exhibits anticonvulsant action against pentylentetrazol-induced seizures in immature rats. *Epilepsy Res*. 2020;169:106523.
39. Czuczwar SJ, Borowicz KK, Kleinrok Z, Tutka P, Zarnowski T, Turski WA. Influence of combined treatment with NMDA and non-NMDA receptor antagonists on electroconvulsions in mice. *Eur J Pharmacol*. 1995;281(3):327-33.
40. Ottosson JO. Experimental studies of the mode of action of electroconvulsive therapy: Introduction. *Acta Psychiatr Scand Suppl*. 1960;35(145):5-6.
41. Dalgaard L, Hjortkjaer RK, Regnier B, Nordholm L. Pharmacokinetics of the neuroprotective glutamate antagonist NBQX (6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(f)quinoxaline-2,3-dione) in mice, rats, and dogs. Interactions with probenecid. *Drug Metab Dispos*. 1994;22(2):289-93.
42. Ekemohn M, Kjær Nielsen M, Grahm M, Tingström A, Kousholt B, Wegener G, et al. Systematic evaluation of skeletal fractures caused by induction of electroconvulsive seizures in rat state a need for attention and refinement of the procedure. *Acta Neuropsychiatr*. 2017;29(6):363-73.
43. Zhu H, Cottrell JE, Kass IS. The effect of thiopental and propofol on NMDA- and AMPA-mediated glutamate excitotoxicity. *Anesthesiology*. 1997;87(4):944-51.